

JP62244382A

MicroPatent Report

TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN

[71] Applicant: AJINOMOTO CO INC

[72] Inventors: MATSUI KAZUHIKO;
SANO TAKANOSUKE;
MIWA KIYOSHI;
OTSUBO EIICHI

[21] Application No.: JP61087600

[22] Filed: 19860416

[43] Published: 19871024

ABSTRACT: A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of Brevibacterium lactofermentum, etc., of the genus Brevibacterium is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RAN, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. COPYRIGHT: (C)1987, JPO&Japio

[Go to Fulltext](#)

[57] Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

CONSTITUTION: A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of Brevibacterium lactofermentum, etc., of the genus Brevibacterium is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RAN, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. COPYRIGHT: (C)1987, JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115



⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法
及びトリプトファンの製造法

⑮ 特 願 昭61-87600

⑯ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑰ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑱ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑲ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑳ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6
㉑ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) α -RNA の合成をコントロールするオペレー
ター領域、 α -RNA の合成をコントロールするプロ
モーター領域、 α -RNA の合成をコントロールする
アテニューエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ
ームと α -RNA との結合領域、リーダーペプチドを
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群
をコードする領域及び最後に α -RNA の合成を停止
させるシグナルを形成するターミネーター領域が
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCCGCTTCTG GGCATTCCGT TCCCTGAGCT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTGTG GCTGGCCCGT TGTGGGTGCT GTCGGGAGTT
 GGGCCAACAC CCGTAAGCAC AGGGACTCCA CGCATTTAGG GTTCTTAACA CCGTATACCG CGTGGCACAG CGACCGGGCA ACACCCACCA CAGCCCTCAA
 TCCTTTGTTA TTGGCTCCGT AGTTCCGTTT GTGGCCCTCT GGTTCGATGT GCGTGGTCTG GGCATTGGGT GTTGTCCGTG CCATCGTCTT CATTCGCATG
 AGGAAACAAT AACGGAGCCA TCAACGCAAA CACCGGAAGA CCAACCTACA CCGACCAGCA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC
 GGTGCGGGTA TGGCTCCGCA TACTGTTCCG ATGCTTGATG CGAACGCGAGT CCGGAAACCC CGCAGGCGGC TGTTCGCGT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG
 CCACGCCCAT ACCGACGCGT ATGACAACCG TACCAACTAC GCTTCCGTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACAAAGGCGA CTTTAACCTC TCCTCCGGCC
 TGTGTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAAGACTCCG CTGAATGCCC CCAAGATTGA CTTGGATGCA GTGCGTAGAG CTGCGGAAAC TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTAACT GAACCTACGT CACGCATCTC GACGCCTTTG ATGTGTTCTT
 CCAAAAAATG ATTAATAATT GAGACAAGCT TCCGACTATG TGATAAAGTC CCATTTTGTG AATAACTCTT GTCTCACTCA AAGCACCCAG TGGTGGTGCC
 GGGTTTTTAC TAATTATTAA CTCTGTTCCA AGGGTGATAC ACTATTTTCA GGTAAACAC TTATTGAGAA CAGAGTCAGT TTCGTGGGTC ACCACACCGG
 GCGCTAACTA AGCGAGCGTG ACACCTCAAG TTGTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGGC TCGTACTTCC TTGACGAAG AAGCGGGCTT TTTGTGGTTT
 CCGGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGGAGTTC AACAAAAGTG AAACCTACTTA AAAAATTCGG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTGCGCCGGA AAACACCAAA
 TTAGCCACCA ACCGGAAGC CCGGATCGA ATGAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT
 AATCGGGTGT TGGCCGTTCC GACCTAGCT TACTTCGAGC GTGCTCATT AATAAACTAC AAAGGGTCTT TCCGAAGTCC GGGTGTACT AAAGGAGCCA
 AGGTGCCCCA TGAGCAGGAA TCCCATCTT TTCTCCCTAG ATGTCCGCTA TCACGAGGAT GCTTCTCGGT TGTTCGCCA CTTCGGTGCC ACAACCGCAG
 TCCACGGGGT ACTGCTGCTT AGGGGTACAA AAGACGGATC TACAGCGGAT AGTGCTCCTA CGAAGACGCA ACAAACGGGT GAACCCACCG TGTGGCGTCC
 ATGATGCAGC CCGTGTGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGGTATT TCTTCCCTCG CCGTGTGAA GAGTTCGGTG CGCATTAGCT GCACGGGCAA
 TACTACCTCG GGACAACCTT TCGGACTAT AGTGGTGGTT CTTACCATAA AGRAGGGAGC GCCACAACCT CTCAGGCCAC CGGTAAATGA CGRPCCCGTT

CAEGGTGGTA ACCGAGCCCG TGACGAGTCC GGGTAGGGCA GTGGTTGCGC GCCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC
 GTGCCACCAT TCGCTCGGGC ACTGCGTAGC CCCATCCCGT CACCAACCGC CGGATTGTGT CGTGGAACCG GTCATGTGTG GCGGTCTCTT GTGGAATCCG
 TTCCCGCGCT CCGATCGGGT TGATGAGCCG GAGCGCCTCA CCGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGCGCA AGTTGCAGTT CGAGTCCGGC TACAGCGAGC
 AAGGGCGGGA CGCTAGCCCA ACTACTCGCG CTCGCGGAGT GCGGTGCTTC GTGGTAGCTT CACGACCGCT TCAACCTCAA GCTCAGCGCG ATGTGCTGCG
 CCGTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGGTTTCC CCTTTGATTT CTTAGAAACC TTTGAAACCG TCCCGCGAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACCCGGATTA
 CGAGGGACGG TGACGAGTAC CCGCCAAAGC GGAACCTAAA GAATCTTTGG AAACCTTTGG AGGGCGCTCA GCTCCTTTCC CAGTTGTGAA TGGGGCTAAT
 CCACTTCGTC CTCGCGGAAA TCGTCCGGA CATCAATCAC CAGGACCAGA CCGCCAAACT CACCGCGCTC TCCAACGGCC CAGGCGAGCT CGAGGCCGAG
 GGTCAAGCAG GAGCGCCTTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCTGTCT GTGCGTTGA GTGGCCGAG AGGTTGCGGG GTCCGCTCGA GCTCCGGCTC
 CTCACAAGC TTTCAATTCT TATCGAGCCG GCGCTCCCGC CAACCGAACA CGCCTACCAA ACCACCGCTC ACCAGCGGCA CACTGTTCCG GTTGTGGCTG
 GAGTTGTTCC AAGCTAACCA ATAGCTCCCG CCGGAGGGGG GTTGGCTTGT GCGGATGCTT TGGTGGGGAG TGCTGCGGCT GTGAGAGGCC CAACACCGAC
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTTACAACG GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGGCGCGCA CTTTACCGCG
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG GCGTGAGTCT AGTTACTCGA CTTTCTTTTG TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTTCACACG GCGCCGCGCT GAAAGTGGCG
 ACCATGTCCT GATGCATTCC CTGCTTATCT GCAGCTGCGT GCCACCAACC CGTGCGCGTA CATGTTCTAT ATCCGTGACG TCAACGAAGG TCGGCTCTAT
 TGGTACAGCA CTACGTAAGC GACGAATAGA CGTCGACCGA CCGTGGTTGG GCAGCGGCAT GTACAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA
 GAACTTTTTG CGGCATCCCC TGAGTCCAAC CTCAGTTCA CCGCTGCTAA CCGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCCGCGCC CGTGGACTCA
 CTTCAAAAAC CGCGTAGGGG ACTCAGGTTG GAGTTCAAGT GCGGACGATT GCGACTCGAC GTGACATGG GTTAGCGTCC ATGGGCGGGG GCACCTGAGT
 ACCGAGATGG CTCCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGACTTGGAT ATGCGCACTG ATGCCAAGA GATCGCGGAC GACACCATGC TTGTGCTATC
 TGGTCTTACC GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGGCGTT ACTCAACCTA TACGCGTGAC TACGTTTTCT CTAGCGCGCT GTGTGGTAGC AACAGCTAGA
 CGCCCGCAAC GACCTCGCCC GCGTCTCGGT CCCAGCGTCC CGCGGGGTTG CGGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC CGGTGATGCA CTTGGTCTCC
 CCGGGCGTTG CTGGAGCGGG CGCAGAGCCA GGGTCCGAGC CGCGCCCAAC GCCTAGAAAA GGTCCACCTA CGGATAAGGG CGCACTACCT GAACACAGG

特開昭62-244382 (3)

CGTGTACGG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG ACGCCTATCG GCGGTGCATG AATATGGCCA CGTTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGCGCTA
GCACACTGCC GCTGCAACCT GGGTCTCGAA CTACGAAACC TCGGATAGC CCGCAGCTAC TTATACCCGT GCAACTGGCC CGCAGGCTTC AACGCGCGAT

TGGAGCTGTT GCGCGGCGTC GAAAACCGCA GCGGTGGTTC TTATGGTGGG GCAGTGGGGT ACCTGCGCGG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT
ACCTCGACAA CGCGCGCGAG CTTTTCGGT CCGCACCAAG AATACCACCC CGTACCCCA TGGACGCGCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TGCTTGGCGG TTTGTCCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTCCAG GCTGGTGGTG GTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AGCCCGATGA GACGTTGCAC
ACCAAGCCGC AAACAGGTCC TACCACACCG ACGACAGCTC CGACCACGAC CACACCAGGC GCTAAGATTA GGAGTTAGAC TTGCGCTACT CTGCAACGTG

AAGGCGTATG CCGTGTGAA TGCCATTGCG CTGTGTGGTG GTTCCACTTT GGAGGTGATC CGATGACACA CGTTGTCTC ATTGATAATC ACGATTCTTT
TTCCGCATAC GGCACAACCT ACGGTAAAGC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAACCTATTAG TGCTAAGAAA

TGCTTACAAC CTGGTGGATG CGTTCGCGGT GCGCGGTTAT AAGTGCACGG TGTTCGGCAA TACGCTGCCA GTTGAAACCA TTTTGGCAGC CAACCCGGAC
ACAGATGTTG GAACACCTAC GCAAGCGGCA CCGGCCAATA TTCAGTGCC ACAAGGCGTT ATGCCACGGT CAACTTTGGT AAAACCGTCG GTTGGGCGCTG

CTGATCTGCC TTTACCTGG ACCTGGTTAC CTTGCGGATG CCGGCAACAT GATGGCGCTG ATCGAGCGCA CACTCGGCCA GATTCTTTA CTGCGTATTT
GACTAGACGG AAGTGGACC TGGACCAATG GGACGGCTAC CCGCGTTGTA CTACCGGAC TAGCTCGCT GTGAGCGCGT CTAGGAAAT GACCCATAAA

GCCTCGGCTA CCAGGCCTC ATCGAATACC ACGCGGGCAA GGTGAGCGCT TGTGGCGCTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCCTTA CTGATGCAGG
CGGAGCGGAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TCGCGCGGTT CCAACTCGGA ACACCGGAC ACGTGGCGTG GTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTCC

TGTGCAGAGC CTTGTTTTG CAGGTCTTGC CACTGATGTT GAGCCTGATC ATCCAGAAGT CCCAGGCGCG AAGGTTCCAA TTGGCGGTTA TCACTCACTG
ACAGCTCTCG GGACAAAAC GTCCAGAAGC GTGACTACAA CTCGCACTAG TAGGCTTCA GGTTCGGCG GTCCAAGGT AACCGGCAAT AGTGAGTGAC

GGCTGCGTGG TTGCCCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGGCA CCGTGTCTC TGAGATTGGT GATGTCATCA TGGCGGCACG CACCAACGAT GGAAGGCCA
CGGAGCGACC AACGGGCTCT GCCATAACTT AGTAACCGCT GGACAAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCCGCGTGC GTGGTGGCTA CTTTTCGGT

TTGGCGTGA GTTACCCCT GAGTCAGTGC TGAGCCCAAC GGGTCCATC ATTTGTGCC GCTGTGTGCA ACAACTTCTC CGGAACCTAAT AAAAAGGATT
AACCGGACGT CAAAGTGGGA CTCAGTCAGC ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACAGGG CGACACAGCT TGTGAAGAG CGCTTGATTA TTTTCTCTAA

TGATTCTGA CTTCTCCAGC AACACTGAAA GTTCTCAAGC CTTACTTGGG TAACCCCACT CCAACCCCTG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTT ACCCGCTGA
ACTAAGTACT GAAGAGTCC TTGTGACTTT CAAGAGTTGC GGTGAACCT ATTGGGGTGA GGTGGGAGC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGGCGACT

CCCTGGGTGA ATACGATGAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CGTACTCGCG GTGAGCAGTT CGCTGATATT GCGGGCGCTG CCAAGGCATT
GGCACCCACT TATGCTACTG CAGCTGTAGC GTGCGGACCA ACGCTGGTAG GCATGAGCGC CACTCGTCAA GCGACTATAA CCGCCCGGAC GTTCCGTAA

CCTCGCGCGG GCTCGTCCGT TCCCGATTAC TGGCGCAGGT TTGTAGATT CCGCTGGCAC TGTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCACCGGG
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA AGGGCTAATG ACCCGCTCCA AACGATCTAA GCGCAGCGTG ACCACCGCTG CCACCGTTGT GGTAGTTGTA GTGGTGGCG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CGGTGGAGTG AAGCTGGCTA AGCACGGCAA CCGTTCAAGT AGCTCCAAGT CCGGTTCCGC CGATGTGCTG GAGGCGCTGA
CGAAGGGACT AGCGTCTAG CCCACCTCAC TTGACCGAT TCGTGGCGTT GCAAGTCAC TCGAGGTTCA GCGCAAGGCG GCTACACGAC ATCCGCGACT

ATATTCTTT GGGCCTTGT GTGGATCGTG CTGTGAAGTG GTTCCAAGCG TCCAACCTCA CTTTCTGTT CACACCTCGG TACAACCTCG CGATTGCGCA
TATAAGGAAA CCGGGAACCT CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCGC AGGTGAAGT GGAAGGACAA GTGTGGAGCG ATGTTGGGAC CTAACCGCT

TGTGCAGCGG GTTGGCCAGG CGCTGAAATT CCCACCATC TTCAACACCG TTGGACCAAT GCTGTCCCGG CCGCGCCCGG AGCGTCAGAT CATGGGCGTG
ACAGTCCGG CAAGCGGTCC CGGACTTTAA GCGGTGGTAG AAGTTGTGCG AACCTGGTAA CGACAGGGCG CCGCGCGGCC TCGCAGTCTA GTACCGCGAC

GCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCC GAGCTCTTCC GCGAGCTGGG CCGTACACCG GCGCTTGTG TGCATGGCGG AGCCACCGAT GAGATCGGAG
CGGTACCGT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCAGAAGG CGCTCGACCC GGCATGTGCG CCGGAACAAC ACGTACCGCG TCCTGGCTA CTCTAGCGTC

TCCACGGCAC CACCTTGGTG TGGCAGCTTA AAGAAGACGG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCGTGA GGACCTTGGC CTTGGCGGCT ACACCTTGA
AGGTGCCGTG GTGCAACCA ACCCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGGTAGCTC GTAATGTGCT AGCTCGGACT CTTGGAACCG GAACCGCGGA TGTGGAACT

GGATCTCGTG GGTGGCGTCC GCACTGAGAA CCGCGAAGCT ATCGCGGCTA CTTTGGCGGG CACCGCGCCT GATGCACACC GTGATCGGTT GCTTGGCTCC
CCTAGACGAC CCACCGGAGC CGTACTCTT GCGGCTTCCA TACCGCGGAT GAAAGCGGCC GTGGCGGGA CTACGTGTG CACTACGCAA CCGACGCGAG

GCAGGTGCGA TGTCTATCT CAACGGCGAT GTGACTCCT TGAAGGATG TGCACAAAAG CCGCTTTCCT TGTGTGCGA CCGGACGACC CAGGCACTGT
CGTCCAGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTTTTC CGCGAAGGGA ACCAAGCGCT CGCTGCTG GTCGCTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGCGCAAGCA CGAAGAGATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCACCGG TGTTCGAAAG CATCGTGGAG GGTCTGCGG
 ACCGGTTGGT GCTTCTCTAG CTAATGAGTC TTTTCCTCAG AAGGTTACTG ATCATTTATTA GACGGGTGGC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGCGG

GACACCTGGA GGAATTCGG GCTCGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGGC CTTCACAAAT CCACCGGCTC TCTGTTCGAT TCCCTCAACC AGGGTAGGGG
 CTGTGGACCT CTTTAAGCG CGAGCGTAGC GAGTGCACCT ACACCTACCG GAAGGTTTTA GGTGGGGGAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC

AGGGCGCGCT TTCATCATGG AGTCCAAGTC CGCATEGGCT TCTTTGGGAA TGATTCTGTA GCACTACCGG CCGGGTGAAG TCGCTCGCGT GTACTCTCGC
 TCCCGCGGCA AAGTAGTACC TCACGTTTAC GCGTAGCGGA AGAAACCTTT ACTAAGCACT CGTGATGGTC GGGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG

TACGCAGCGG CAATTTCCGT GCTGTGGAG CGCGATCGTT TTGGTGGGGA TTACGATCAC CTGGCTACCG TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT
 ATGCGTCCCG GTTAAAGGCA CGACACGCTC GGGCTAGCAA AACCAACCGCT AATGCTAGTG GAGCGATGGC AACCGGATG GAGACTAGAA GGGCAGGACA

GCAAGAGCTT CATCATGAT CCTGTCCAGG TACGACCGGC GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATCAAGAGTA
 CGTTTCTGAA GTAGTAACCT GACAGGCTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACGACTAC GGTAGGACGA GTACGAGAGA CACGAACCTAC TACTTCTCAT

CGACCGACTC GGTGGCGAGG CTGGCGGTTT TGATCTGGAT ATCTCACCGG AGGTTATTGA TGAGGAGGAA GTCCCGCGCG CCATCAAGCT GGTGCGGAAG
 GGTGGGTGAG CGACGGCTCC GACGCGGAAA ACTAGACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTGCTCCTT CAGCGGGGCG GGTAGTTGGA CCCACGCTTC

ATCTTTGGCG TCAACCACCG CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTGGGA TCGTTACCGT CGCCTGTCCA AGCTCATTTCC AGCAGATGCC GTGCTCGTGT
 TAGAAACCGC AGTTGGTGGC GTTGGACGTA CTAGACAGGT AACTAAACCT AGCAAGTGCA GCGGACAGGT TCGAGTAAGG TCGCTACCG CACGAGCACA

CTGAGTCTGG CGTGCGCGAT ACCGAAACCG TCGCGCAGCT AGGTGGGCAC TCCAATGCAT TGCTCGTTGG CTCCAGCTG ACCAGCCAGG AAAACGTGGA
 GACTCAGACC GCACCGGCTA TGGCTTTGGC AGGCGGTGGA TCCACCGCTG AGGTTACGTA AGGAGCAACC GAGGGTCGAC TGGTGGGTCC TTTTGCACTT

TCTGGCAGCC CGCGAATTGG TCTACGGCCC CAACAAAGTC TCGGAGTCA CCTCACCAAG TGCAGCAGAA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGC GGTCTACGGC
 AGACCGTGGC GCGCTTAACC AGATGCCGGG GTTGTTCAG ACCTCTGAGT GAGTGTGTTT ACCTGCTGTT TGGCGAGCGC GTCGCCACCG CCAGATCGCG

GCGCTCATCT TCGAAGAGGC ATCGCCACGT AATGTTTACG GTGAAACATC GCAAAAATC ATCGCCCGAG AGCCCAACCT GCGCTACGTC GCGGTACGCG
 CCGGAGTAGA AGCTTCTCGG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CTTTTTTAG TAGCGGCGTC TCGGTTGGA CGCGATGCG CCGCAGTGG

CTCGCACCTC CCGGTACAG GATTTGCTTG TCGACGGCAT CTTCGCGCTA CAATCCACG CCCCACCTGA GGGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCATTGAT
 CAGCGTGGAG GCGCATGTTT CTAACGAAAC AGCTGCGGTA GAAGCGGCAT GTTTAGGTTG GGGGTGACGT CCGGTGCGAG CTTCGTCTTT TCCGTAACTA

GCGCGCGCTT CGTGAAGAGG TTGGACCGCA GGTCCAGGTC TGGCGCGGGA TCTCGATGTC CAGCCCGCTG GGGGCTAAG TGGCAGAGGG TGACCTCGAT
 GCGCGCGCAA GCATCTCTCC AACCTGGCGT CCAGGTCCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG GTCGGGGAAC CCGGACTTC ACCGTCTCC ACTGACGTA

AAGCTAATTC TTGATGCCCA TGAAGGTGGC AGCGGGGAAG TATTGCACTG GGCTACGGTG CCGGCGGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC GCGGGAGGCA
 TTGATTAAG AACTACGGCT ACTTCCACCG TCGCGCTTC ATAAGCTGAC CGGATGCCAC GCGCGCGGAC ACTTCGCTTT CAGAAACGAG CCGCTCTCGT

TCTCTCGGGA CAACGCTCGC CAGGCACTCG CTGTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGGCGTGGA ATACCCCGCC GGTGCAAGGA CGTGGGCTG
 AGAGAGCGCT GTTCCGACCG GTCCGTGAGC CACACCGGAC GCGTCCAAT CTGTACTTGA GACCGCACCT TATGGGGCGG CCAGCTCCGT GCACCCCGAC

GCGCGAAAGA TGCGGGCGCG CTGCTGAAAA TTTTCGGGAC CATCTCCACA TTCCATTACT AAAGGTTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAA GAAACTTGG
 CCGGCTTTCT ACCGCGCGCG GACGACTTTT AAAAGCGGTC GTAGAGGTCT AAGGTAATGA TTTCCAAAT TATCTAGTA CTGACTTTT CTTTTGAACC

GCGGCTCCAC GCTGCTACCT GCATACTTCG CTGAATTCGG CGGCCAGTTC GTCGCGGAAT CCTCCTGCG TGCTCTGAG CAGCTGGAGA AGGCTTCTGT
 CCGCGAGGTC CGACGATGGA CGTATGAAG CACTTAAGCC GCGGCTCAG CAGCGGCTTA GGGAGGACGG ACCAGAGCTG GTCGACCTCT TCCGAAGCA

TGACGCGACC AACAGCCAG AGTTCCGCGA AGAACTCGGC GGCTACCTCC GCGATTATCT CCGCGCGCCA ACCCGGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA
 ACTGCGCTCG TTGTGGGTC TCAAGGCGCT TCTTACCGCC CCGATCGAGC CGCTAATAGA GCGGCGGGT TCGGCGGACT GGTTCAGAG GTTGCACGGT

CTCGCAGCGC AAGCCAAAGC CTTTGGCGCG ATCTTCTCTA AGCGCGAAGA CCTCGTCCAC GCGGCTGAC ACAAACCTAA CCAGGTGATC GCGCAGGTC
 GAGCGTCCG TCCGTTTCC GAAACCGGCG TAGAAGGAGT TCGCGCTTCT GAGCAGGTC CCGCACGTC TGTTTTGATT GGTCCACTAG CCGGTCCAGC

TGCTTGCCAA GCGCATGGC AAAACCGCA TCATCGGAGA GACCGCGGCA GCGCAGCAGC GCACCGGAC CGCTCTGCA TGTGGCTCA TGGGCTCGA
 ACGAACGGT CCGGTACCGG TTTTGGGCGT AGTAGGCTCT CTGGCGCGCT CCGGTCTGTC GGTGGGGTG GCGAGAGCGT ACACGCGAGT ACCCGGAGCT

GTGCTTGTG TACATGGGCG CCAAGGAGCT TGCGCGGAG CAGCGCAAGC TCTACGGAT GCAGCTGCAC GCGCGGAAG TATCCCGCT GGAATCTGCT
 CACGCAACAG ATGTACCGG GGTTCCTGCA AGCGCGGCTG CTCGGCTTC AGATGGCGTA CGTGCAGTC CCGGCTTCC ATAGGGGCA CTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCACCC TCAAGGACGC CGTGAATGAA GCGGTGCGCG ATTGGACCGC AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCC GCGCGGCAGC
AGGGCGTGGG ACTTCTCTGG CCACTTACTT CCGGACGCGC TAACCTGGCG TTGGAAGGTC CTCAGGGTGA TGGAAAGACC GTGGCGCGCG CCGGCGGTGG

CATTCCCAAC CATCGTGGT GAATTCACAC AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCG CACCGGCAAG CTTCGGACG TTGTGGTGGC
GTAAGSGTTG GTAGCACGCA CTTAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCGTGTCT ACGATCTGCG GTGGCGGTTG GAAGGGCTGC AACACCAGCG

CTGTGTGGT GGTGGCTCCA ACGCCATCGG CATGTTCGCA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTGGCGGCTG AGCCAGCCGG TGAAGGCTC
GACACAGCCA CCACCGAGGT TCGGTAGCG GTACAAAGCT CTCAACTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGCGAC TCGGTGGGGC ACTTCGGGAG

GACTCGGCA AGCAGGCGC AACCATCACC AACGGTCAGA TCGGCATCCT GCACGGCACC CGTTCTTACC TGATGCGCAA CTCCGACGGC CAAGTGGAAAG
CTGAGGCGGT TCGTGGCGCG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT AGCCGTAGGA CGTGGCGTGG GCAAGGATGG ACTACGCGTT GAGGCTGGCG GTTCACTTC

AGTCTACTC CATCTCGGC GGAATTGATT ACCCAGGCGT CCGCCACAGC ACCCACACCT GCACGCCACC GCGCGGCACT ACGTTGGTAT CACCGACGCC
TCAGGATGAG GTAGAGGCGG CCTGAACATA TGGGTCCGCA GCGGTGTGCG TCGGTGTGGA CGTGGCGTGG CCGCGCGTGA TGCAACATA GTGGCTGGCG

GAAGCGCTCC AAGCATTCAC GTAGGCTCGC CCGCTACGAA GGCATCATCC CCGGCACTGG AATCCTCACA CCGGTTCGGC TACGACTCAA GCGCGCAAG
CTTCGGCAGG TTGCTAAGGT CATCGAGCG GCGGATGCTT CCGTAGTAGG GCGCGTGACC TTAGGAGTCT GCGCAAGCGG ATGCTGAGTT CCGCGGCTCC

ACCGCGAAG AGGAAGGCGA GAATTAACC ATCCTCGTCT CCGTATCCGG CCGTGGCGAC AAGGACGTTG ACCATCGGCG CCGCACCCCTC GAAGAAATC
TGGCGGCTTC TCCTTCGGGT CTTCAATTGG TAGGACAGC GCGATAGGCC GGCACCGCTG TTCTTCAAC TCGTAGGCGG GCGGTGGGAG CTCTTTTAG

CAGAACTGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CCGTTACGAC GATCTTTTTG GCGACGGCTC GACACGGTCA GGGGAGGGCG CCTTTGTTCC CTTCATCATG
GTCTTGACTA GGAATTCCTG TTGGCTACTC GCGAATGCTG CTAGAAAAAC CCGTGGCGAG CTGTGCCAGT CCGCTCCGCG GGAACAAGG GAAGTAGTAC

CTAGCGGACC CTTCACCAGA GCGGGCTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAAGCTGGC GCAGATGCAC TGGAACTTGG CGTACCTTTC TCCGACCCAG
GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CCTCCGAAG GTCTAGTAGA GGTGTGTTA GCTTGCACCG CGTCTACGTC ACCTTGAACC GCATGGAAAG AGGCTGGGTC

TTGCCGATGG CCGCACCGTC GCGGAATCCG ACCTCGGCGC ACTCGAGGCG GCGGCCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGGACCG
AACGGCTACC GCGGTGGCAG GCGCTTAGGG TGGAGGCGCG TAGCTGCGCG CCGCGGTGGC ATCTGTGCGG TGAGTCTGTC TAGTTCGGCG ACGCGGCTCG

CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTTCA CCGGTGGGTT GATCGGCTTC TACCAAGAGT TCGGTGAAGC TGGCGCAGAC
GATGGGTCTC CAAGGGTAGC CTTACGACTA GATGCCGTTG CAAGGAAGT GCGCACCGAA CCTAGCGAAG ATGGTTCTCA ACCGACTTCC ACCGCTCTC

TCCATCTCTC TCCAGACGT CCCAGTCCGC GAAGCGGCGC CGTTTTCTGC AGCAGCCGGA GTTCATCCCA TTACATCCG TCCGGCCAAAC GCGACCGAGA
AGGTAGGAGG ACGGTCTGCA GGTGAGGCG GTTCCGCGTG GCAAAAGAGC TCGTGGGCTT TAAGTAGGCT AAATGTAGCG AGGCGGGTTG GGTGCGCTCT

AAACCTCTCA GGTGTCTTC GCGGCATCAA AGGGCTACAT CTACGCCATC TCCGCGGAGC GCGTCACCGC CACCGAAGCT GAATCATCCA CCGACGGGCT
TTTGGGAGCT CCCACAGAG GCGCGTAGTT TCCGATGTA GATGCGGTAG AGGCGGCTGC CCGAGTGGCG GTGGCTTGA CTTAGTGGGT GGTGCGCGGA

GTCCGAGTG GTGGACAACA TCAAGAAATT TGATGGCGCA CCCATCCTCT TGGGCTTCGG CGTCTCATCC CCTCAGCAGC TGGCAGAGCG GATTGACGG
CAGGCGTCAC CACCTGTTGT AGTTCTTTAA ACTACGGCGT GGTAGGAGA ACCCGAAGCC CTGCAGTAGG GGAGTCTGC ACCGTCTGCG CTAACTGCG

GGTGGTTCCG GTGGGATCAC GGGTTCCGCG ATCACCAGGA TCATTGCTTC CCACTGCGAA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA GATATGGAGC
CCACGAAGGC CAGGCTAGTG CCGAAGGCGG TAGTGGTTCT AGTAACGAAG GGTGACGCTT CCACTCGTGG GCTTGGGCGG GTGGTAAGCT CTATACCTGC

GTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTCACT GTCCGACTGA AGGCAGCGAC CAAGAAGGT TAGGCGTTTA AATGTGGCAA TGTTTCAGCT GAACATTCT
CAAACTTCTT CCTAGAGTGA CTCAAGTAGA GACGCTGACT TCCGTGCGTG GTTCTTCCAA ATCCGGAAAT TTACACCGTT ACAAGTGCA CTTTGTAGA

GAGACAATGT AGAAACATCA AGAAGCCAC CTCCTAGCTC TCGGCTGGG AGCGGCTTC TTGTTTTGCG GTTTAGGAAA TCTCAGGCTT TTGGAGATCT
CTCTTTTACA TCTTTCTAGT TTCTTGGTG GAGGATCGAG AGCCGACCC TCCGCGAAG AACAAACGC CAAATCTTT AGAGTCCCA AACCTCTAGA

TAGCTTCGAG CCGGTGGGT AGGAGCGGCC GCGGAGGAG CAATCTTAGG GTAGGTCGA GCGCCAGCGG TTGGAGTGGC ATCAGCTTC GCTTCCGCA
ATCAAGCTC GCGCACCCCA TCCGCGGGG CCGCTCTCT GTTAGAATCC CATCCAGGCT CCGGCTCGCG AACCTCACCG TAGTGCAAGG CGGAAGAGGT

CAGCGCTACC GTTGGGAGCT GCATCC
GCGCGATGC CAACCTCGA CCTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNA が人工的に合成されたDNA 又は微生物に由来するDNA である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレビバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNA が1部置換、変異又は削除されたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNA がプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNA を用いるレトリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリアプトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)

第 2 式

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MSTNPHVFSL DRYBEDASA LFAHLGGTTA DDAALLESAD ITTKNGISSL AVLKSSVRIT CTGNTVVTQP LTDSGRAVVA RLTOQLGDYN TAENTFSPPA									
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
SDAVDERERL TAPSTIEVLR KLFESGYSD ASLPLLHGGF AFDLETPT LPAVEESVNT YPDYQFVLA EIVLDINHQQ TAKLTGVSNA PGELEAELNK									
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSLLIDAALP ATERAYQTP HDGOTLRVVA DIPDAQFTQ INELKENIYN GDIYQVVPAR TFTAPCPDAF AAYLOLRATN PSPYMFYIRC LNEGRSYELF									
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
GASPEENLXF TAANRELQLY PIACTRPRCL NPDGSINDEL DIRNELDMRT DAKETADDTM LVDLARNDLA RVSVPASRRV ADLLOVDVRS RVNHLVSRVT									
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ATLOPELDAL DAYRACNMGC TLTCAPKLRA MELLRCVKEK RRGSYGGAVG YLRNGCDMDN CIVIRSAFVQ DGVAAVQAGA GVVROSHPOS EADETLHKAY									
510	520								
AVLNAIALAA CSTLEVIR -									

第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTHVVLIDNH OSFVYNLVDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAANPDILCL SPGPGYPADA GMMHALIERT LGQIPLLGIC LGYQALIEYN GCKVEPCGPV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 HGTDDHMIT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPCRKVPI GRVHSLGCVV APDGIESLCT CSSEIGDVIH AARTTOCKAI CLQFIIPESVL SPTGPIILSR
 210
 CVEQLLAN*

第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSPATLKVL NAYLDNPTPT LEBAEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAE AAKAFIAAAR PFPITGAGLL DSAGTGGOGA NTINITTGAS
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 LIAASGGVKL AKHGNRSVSS KSGSADVLEA LNIPLGLDGD RAVKMFEASH FTPLFTPAYH PAIAHVQPVH QALKPPTIFN TLGPIILSPAR PERQINGVAN
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ANHGOLIAEV FRELCRTRAL VVHCAGTDEI AVHGTTLVWE LKEDGTIEHY TIEPEDLCIG RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACTGCPDA HRDALAASAG
 310 320 330 340 350
 AMFYLNQDVO SLXQGAQKAL SLLADATTOA WLAKHEEIDY SENESSND*

第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSNNLPTVL ESIVEGRBCH LEEIRARIAH VQVDALPKST RSLFOSLNQG RGGARFIHEC KSASPSLGH IREHYQPGEIA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GDYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIIDPVQVR PARYFGADAI LLMLSVLQDE EYDALAAEAA RFDLIDILTEV IDDEEVARAI KLGAKIFGVN HRNLHDSID
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 LDRSRRLSKL IPADAVLYSE SGVROTETVR QLGGDSNAFL VGSQLTSDEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAGTARAA GAVYGGLIFE EASPRNVSRE
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TSQKIIAEP NLRVAVSRR TSGYKOLLVD GJFAVQIHAP LQGSVEAEKA LIAAVREEVG PQVQVWRAIS MSSPLGAEVA EGDVDKLILD ANEGGSGEVF
 410 420 430 440 450 460 470 480
 DWATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSG VEYPACAGTW GWCERCRAA ENFRDLNIP LLKV *

第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGG TLLPAYPGEF GGQFVAESLL PALDQLEKAF VDATNSPEPR EELGGYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLAGECK GFARIFLKRE DLVHGGAHKT

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
NQVIGQVLLA KRMGKTRIIA ETCAGQHGTA TALACALMGL ECVVYMGAKD VARQOPNVYR HOLHGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALRDMT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPUPFP TIVREFHKVI SEEAKAQMLE RTGKLPOVVV ACVGGGSNAI GMFADFIDDE GVELVGAEPG GEGLDSCGKG ATITHGQIGI LMGTRSYLNR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
MSOGQVEESY SISAGLDYPC VGHSTHTCTP PARTTLVSPT PKPSKNSSSL ARYEGIIPTT GILTRVRLRL KRAKTAEEEG QNLTIIVSLG GCGDXVDNR

410     420
AGTLEENPEL ILKDNR

```

第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFHLSQPS PEEAFQIIST AIERGADALE LGVPPSDPVA DGPTVAESNL RALDGGATVD SALEQIKRVR AAYPEVPIGN

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGNVPFTR GLDRFYQEPF EAGADSILLP DVPVREGAPF SAAACIDPIY JAPANASEKT LEGVSAASKG YIYALSRCV TCTERESSTD GLSAVVONIK

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSPDHVA DATAAGASGA ITGSAITKII ASHCCEGHPW PSTIRDMDGL KXDLTEFISA TEGSDQEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニューエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるL-トリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージェス・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレビバクテリウム・サッカロリチウム	ATCC 14066
ブレビバクテリウム・インマリオフィウム	ATCC 14068
ブレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム	ATCC 13869
ブレビバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレビバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレビバクテリウム・チオゲニタリス	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	ATCC 17965

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム	ATCC 15354
---------------------	------------

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニューエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域 (*trpL*)、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (*trpE*, *trpG*)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (*trpD*)、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (*trpB*, *trpA*)の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

し (例えばH. Saito and K. Miura Biochem. Biophys. Acta 72, 619 (1963)の方法が使用できる。)、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離 (クローン化) でできなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、市販の種類制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE. coli、B. subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- | | | |
|------|----------|-------------------|
| (1) | pAM 330 | 特開昭58-67699参照 |
| (2) | pAM 1519 | 特開昭58-77895参照 |
| (3) | pAJ 655 | 特開昭58-192900 参照 |
| (4) | pAJ 611 | 同上 |
| (5) | pAJ 1844 | 同上 |
| (6) | pCG 1 | 特開昭57-134500 参照 |
| (7) | pCG 2 | 特開昭58-35197参照 |
| (8) | pCG 4 | 特開昭57-183799 参照 |
| (9) | pCG 11 | 同上 |
| (10) | pCC 1 | 特開 (Mautin/Ajico) |

- (11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所で切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol., Biol., 53, 159(1970)) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

法、またはパチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153(1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen., Genet., 168, 111(1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, D.A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Frink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のパチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはブレバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

ブレバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、ブレバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、ブレバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アザセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagino, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に、応じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファンの生産蓄積が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、プレバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インク

ーフエロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが緊用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異ならないように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むプレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼ β サブユニット遺伝子のクローニング

1-1 プレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225(PERM-P4370) を1 μ lのCMG培地（ペプトン1g/dl、酵母エキス1g/dl、グルコース0.5g/dl、及びNaCl0.5g/dlを含み、pH7.2に調整したもの）に接種し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDSで溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に3.5 μ gのDNAを得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとしてpAJ1844（分子量5.4メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まず pAJ1844 をプラスミドとして保有するプレバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ12037 を 100 ml の CMG 培地に接種し、30℃ で対数増殖期後期まで培養したのち、リゾチーム SDS 処理により溶菌させ、30,000×g、30 分の超遠心により上清を得た。フェノール処理ののち、2 容のエタノールを加えて DNA を沈澱回収した。これを少量の TEN 緩衝液 (20 mM トリス塩酸塩、20 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解後、塩化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠心によりプラスミド画分を分離し、最終的に pAJ1844 プラスミド DNA 約 200 μg を得た。

1-3 染色体 DNA 断片のベクターへの挿入

1-1 で得た染色体 DNA 10 μg と 1-2 で得たプラスミド DNA 5 μg とを制限エンドスクレアーゼ Pst I でそれぞれを 37℃ に 1 時間保持し、切断した。65℃ に 10 分間加熱した後、両反応液を混合し、ATP 及びジチオスレイトール存在下、T₄ フェージ由来の DNA リガーゼによって 10℃ に 24 時間保持し DNA 鎖を連結せしめた。ついで

反応液を、65℃ にて 5 分間加熱し、反応液に 2 倍容のエタノールを加えて連結された DNA の沈澱を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、及びトリプトファンシンターゼ β サブユニット遺伝子のクローニング

プレバクテリウムラクトフェルメンタムのアンスラニル酸シンターゼ欠損株 AS60、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株 №38、トリプトファンシンターゼ β サブユニット欠損株 №30 (いずれも AJ12125 を親株とし、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した) を DNA 受容菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトランスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を 5 ml の CMG 液体培地で対数増殖期の初期まで培養し、ペニシリン G を 0.6 ユニット/ml 添加後、さらに 1.5 時間振盪培養し、遠心分離により菌体

を集め、菌体を 0.5 M シュークロース、20 mM マレイン酸、20 mM 塩化マグネシウム、3.5 % ペナッセイブロス (Difco) からなる SMMP 培地 (pH 6.5) 0.5 ml で洗浄した。次いで 10 mg/ml のリゾチームを含む SMMP 培地に懸濁し 30℃ で 20 時間プロトプラスト化を図った。6000×g、10 分間遠心分離後、プロトプラストを SMMP で洗浄し 0.5 ml の SMMP に再度懸濁した。この様にして得られたプロトプラストと 1-3 で調製した DNA 10 μg を 5 mM EDTA 存在下で混合し、ポリエチレングリコールを最終濃度が 30 % になる様に添加した後、DNA をプロトプラストに取り込ませるために室温に 2 分間放置した。このプロトプラストを SMMP 培地 1 ml で洗浄後、SMMP 培地 1 ml に再懸濁し、形質発現のため、30℃ で 2 時間培養した。この培養液を pH 7.0 のプロトプラスト再生培地に塗布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水 1 l あたり トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 12 g、KCl 0.5 g、グルコース 10 g、MgCl₂ · 6H₂O 8.1 g、CaCl₂ · 2H₂O 2.2 g、

ベプトン 4 g、粉末酵母エキス 4 g、カザミノ酸 (Difco 社) 1 g、H₂PO₄ 0.2 g、コハク酸ナトリウム 13.5 g、寒天 8 g 及びクロラムフェニコール 3 μg/ml を含む。

30℃ で 2 週間培養後、各受容菌について各々約 25000 個のクロラムフェニコール耐性コロニーが出現してきたのでこれを最少培地 (2 % グルコース、1 % 硫酸アンモニウム、0.3 % 尿素、0.1 % リン酸二水素カリウム、0.04 % 硫酸マグネシウム 7 水塩、2 ppm 鉄イオン、2 ppm マンガンイオン、200 μg/l サイアミン塩酸塩、50 μg/l ビオチン、カザミノ酸 (Difco) 3 g/l、クロラムフェニコール 10 μg/ml、pH 7.0、寒天 1.8 %) にレプリカし、クロラムフェニコール耐性でかつトリプトファン要求性の消失した株を AS60 を用いた区分から 2 株、№38 を用いた区分から 1 株、№30 を用いた区分から 1 株得た。

上記 5 株からプラスミドを抽出したところ、いずれのプラスミドもベクタープラスミド pAJ1844 よりも明らかに大きく、AS60 を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたクロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換体では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2、

ブレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング
ブレビバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSall、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside), IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含む寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kb.のPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grunstein, M., Wallis, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素Sallを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、Sall区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。

その結果、ptrpE97はptrpE36、~~ptrpD3851~~、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及び~~ptrpD3851~~のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-Sall断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド p33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分画し SstI, Hind IIIで切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8, λ^-) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いは SstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coli の要求性を消失させた。

3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド p

列はブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要な RNA ポリメラーゼの結合部位 (trp プロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) に対応する DNA 配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと trpE 構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに関与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに関与するリーダーベプチド (trpL) をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHI で切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5644 (trpA33, rha-7, λ^-) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。

実施例4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られた p19, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示す DNA 塩基配列が得られ、この塩基配

実施例5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、p27, 151 (1984)) にサブクローニングした。得られた組換えプラスミド p

さらに、pAM330 由来のトリメトブリム耐性のベクター、pAJ226 の PstI 切断部位に PstI で切断した上記組換えプラスミド p

第1表 カザミノ酸を添加した最少増地におけるテトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	テトラサイクリン耐性度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		トリプトファン添加 ($1\text{mg}/\text{mL}$)	
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加	トリプトファン無添加	トリプトファン添加
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentum</i>	25	25	5	5
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20	20	20
クロラムフェニコール耐性度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)				
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <	600 <
pEB003TR* in <i>E. coli</i>	400	400	200	200

*pEB003TRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミド pAJ234 を用いて、L-トリプトファン生産について検討した。

pAJ234 を用い、m-フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株 *Brevibacterium lactofermentum* M247 を用いて述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られた AJ12195 (PERM-P8014) を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産増地 (グルコース 130 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g、フマル酸 12 g、酢酸 3 mL、 KH_2PO_4 1 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g、d-ビオチン 50 μg 、サイアミン塩酸塩 2000 μg 、メチオニン 400 mg、チロシン 650 mg、大豆蛋白加水分解液「味液」50 mL、 CaCO_3 50 g を水 1 L に含む、pH 6.5) 20 mL を 500 mL の坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中の L-トリ

次にプロモーター領域をさらに限定するため、EcoRI-HindIII 断片を AluI 或いは、HaeIII で切断し、各断片を pKK¹⁷⁵⁻⁶ 上にサブクローン化した (第5図)。その結果 AluI-HindIII 断片 (51bp) 及び HaeIII-HindIII (135bp) 上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を *E. coli* のプロモータープロベクター pKK232-8 (Ap 耐性、クロラムフェニコール感受性) を用いて得ており、AluI-HindIII 断片 (51bp) 上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例 6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングした *Brevibacterium lactofermentum* M247 のうち trpD, trpC, trpB, trpA の4遺伝子を有する組換えプラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042 を定菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株の L-トリプトファン蓄積量

菌株	L-トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dL
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dL

尚、M 247 を得るためには寄託された AJ 12195 より宿主細胞を換うことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる (Bact. Rev., 36, p361-405 (1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195 を CMG 液体増地に接種し、37℃で一晩培養 (高温処理) 後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しない CMG 寒天増地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクロラム

フェニコール感受性株として分離される株が
n 247 である。

4. 図面の簡単な説明

第 1 圖

組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素消化図

第 2 圖

ブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの塩基配列決定のため
の戦略図

種々の制限酵素で切断したDNA断片をpUC18, pUC19 或いはM13mp10 にクローン化し、矢印で示した方向へ、dideoxy 法により塩基配列を決定した。

第 3 圖

ブレヴィバクテリウムラクトフェルメントムの
トリプトファンオペロンの制御領域
—ブレヴィバクテリウムラクトフェルメントムの
trpE構造遺伝子の 5' 上流域の塩基配列並びに
推定されるアミノ酸配列、及び、予想される

RNA の 2 次構造 -

第 4 圖

ブレビバクテリウムラクトフェルメントムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の単離、同定のための戦略

第 5 図

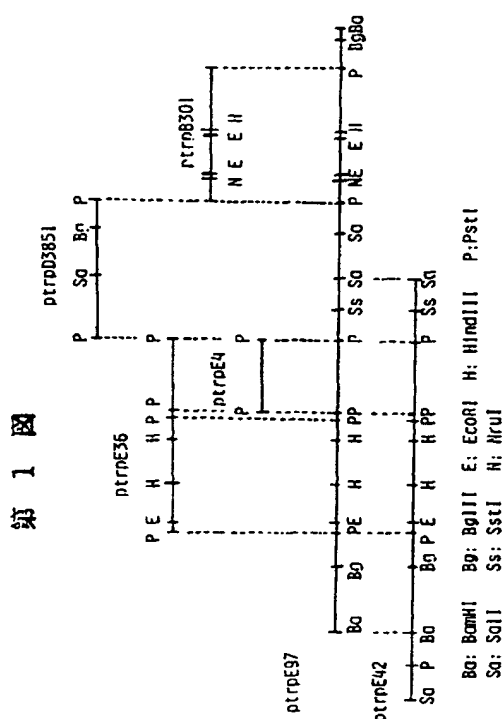
プレバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンの構造とプロモーター、
オペレーター領域の限定のための戦略

-35 及び-10 は*E.coli*のプロモーターコンセンサス配列の-35、及び-10領域に相当する領域を示す

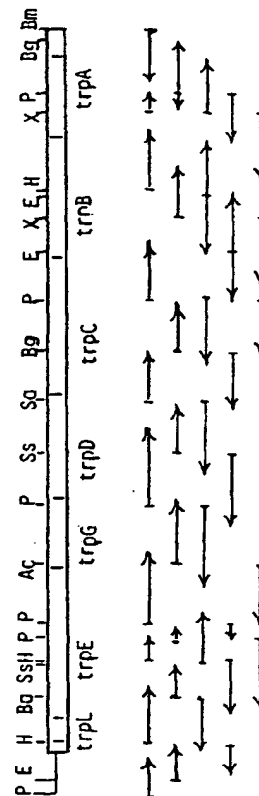
第 6 図

プレビバクテリウムラクトフェルメンタムの
トリプトファンオペロンのターミネーターの構
造

特許出願人 味の素株式会社



附录 2



第 3 図

```

-35      -10      trpL      MetAsn
TACACAGAACCCAAATGATTAAATTTGAGACAAGCTCCCACTATGTGATAAAGTCCCATTTTGTGAAT
AsnSerCysLeuSerGlnSerThrGlntrpLArgAlaAsn...
AAGCTCTGTCTCAGTCAAGCACCACCGAGTGGTGGCGGCTAACTAAGCGAGCCTGACACCTCAAGTTGTTT
TCACTTTGATGAATTTTAAAGGCTCGTACTTCGTTTCGACGAGAGCGGGGCTTTTGTGGTTTTCAGCCAC
AACCGGCAAGCCCTGGATCGAATGAAGCTCGGCGGAGTAAATTATTGATGTTTCCACAGAAAGGCTTCAGGCC
CACAAATGATTTCCACGGTAGGTCGCCCATGAGCAGCAAT
MetSerThrAsn
trpE

```

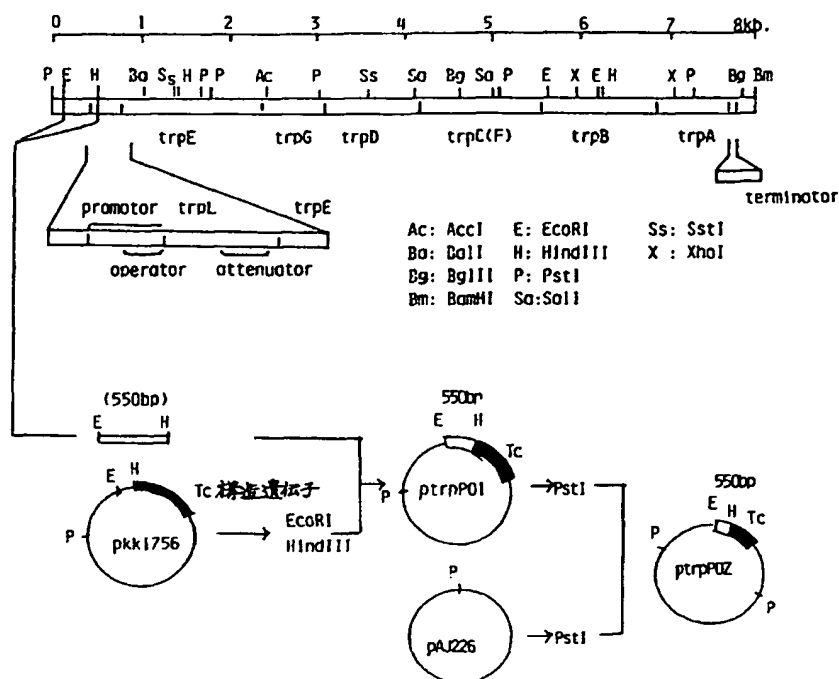
第 5 図

```

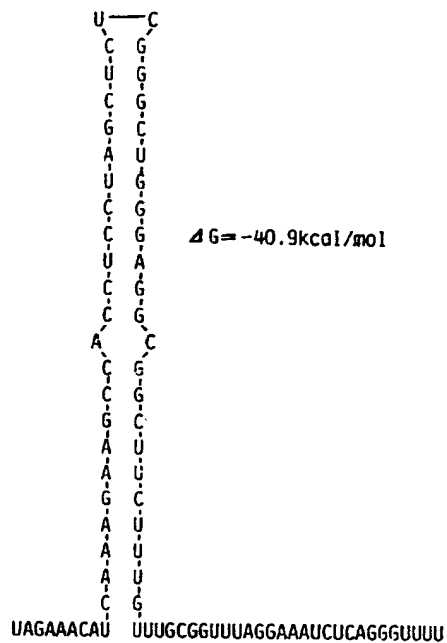
HaeIII
AGGAGGCTGG 1GGTGTGACT ATTACTCTCC GGTATTCAG CAAGACTCCG CTGAATCCC CCAAGATTGA
TCTCTGGCTT ACCACACTGA TAAATGAGCC GCTATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTAAGT
CTTGGATGCA GTCCCTAGCG CTCCGGAAC TATCTAGAA CCCAAGATG ATTATATAT GAGACAGCT T
GAACCTACGT CAGGCATCTC GAGGCTTTG ATGAGTCTT GGGTTTATC TATATATTA CTCGTCTGAA
AluI -35 -10 HindIII

```

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

// C 12 P 21/02
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:15)

6712-4B

昭和61年6月3日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第87600号

2. 尾明の名称

トリアトファンオペロン、トリアトファンオペロンにコード
されるペプチド及び蛋白、トリアトファンオペロンの遺伝子
発現利用方法及びトリアトファンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (006) 味の素株式会社

代表者 取締役社

4. 補正命令の日付

自死

5. 補正により増加する発明の数

なし

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

および図面（第1図、第2図、第4図）

6. 4

二、三、四

—

圖一

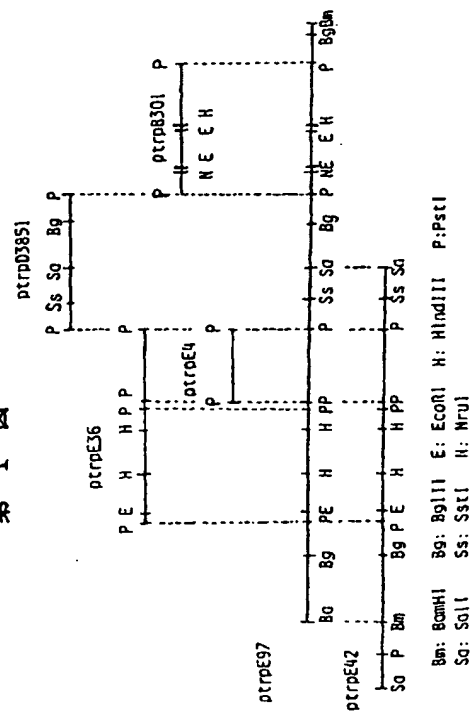
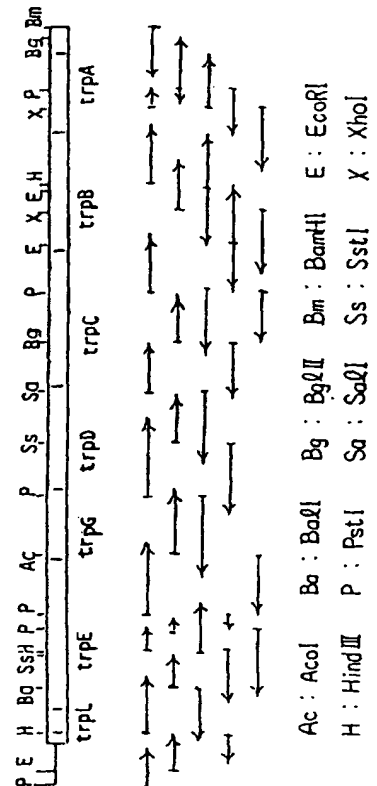


图 2 第



Ac : AcoI Bo : BoqI Bg : BgqII Bm : BamHI E : EcoRI
H : HindIII P : PstI Sa : SaeI Ss : SstI X : XhoI

第 4 図

